

Rec'd PCT/PTO 20 JUN 2005

T/CN03/01068 #2

证 明

REC'D 10 MAR 2004

WIPO

PCT

本证明之附件是向本局提交的下列专利申请副本

申 请 日: 2002 12 18

申 请 号: 02 1 56785.9

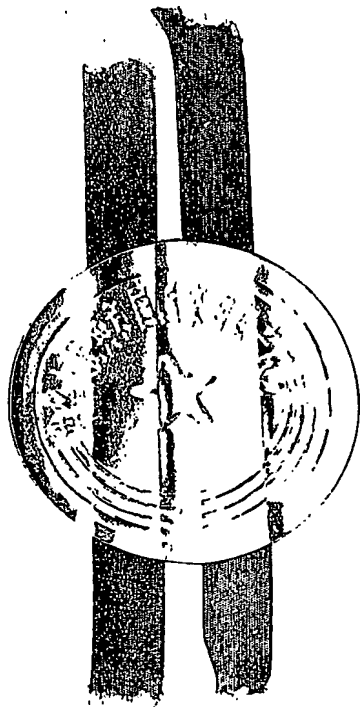
申 请 类 别: 发明

PRIORITY DOCUMENT
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH
RULE 17.1(a) OR (b)

发明创造名称: 一组抗H I V感染及防治艾滋病的核苷酸序列及其应用

申 请 人: 北京昭衍新药研究中心

发明人或设计人: 周志文; 冯宇霞; 左丛林; 李月娟



中华人民共和国
国家知识产权局局长

王景川

2004 年 2 月 25 日

BEST AVAILABLE COPY

权 利 要 求 书

1、一组抗 HIV 感染及防治艾滋病的 RNA 序列及其片段, 该组 RNA 序列如下:

- (1) aucaaugaggaagcugcagaaugg;
- (2) gggaaagugacauagcaggaacuacuag;
- (3) uaaauaaaauaguaagaauguauagcccu;
- (4) uauggggguaccugugugga;
- (5) gccaaauucccauacauuauugugc;
- (6) uuaaauggcagucuagcagaa;
- (7) accacacacaaggcuacuucccugau;
- (8) acagccgccuagcauuucaucac;
- (9) ggaugggugcuucaagcuaguaccaguu.

2、一组由权利要求 1 所述的 RNA 序列及其片段和与之互补的序列杂交形成的双链 RNA 序列。

3、一组由权利要求 1 或 2 所述的 RNA 序列及其片断在其 5' 端或 3' 端加核苷酸修饰的序列。

4、一组由权利要求 1 或 2 所述的 RNA 序列及其片段和与之反向互补的序列加上中间非互补连接序列形成的发夹样 RNA 双链。

5、一组权利要求 1 或 2 所述序列对应的 DNA 序列。

6、一组权利要求 3 所述序列对应的 DNA 序列。

7、一组权利要求 4 所述序列对应的 DNA 序列。

8、包含权利要求 1 或 2 所述的 RNA 序列的表达载体。

9、包含权利要求 3 所述的 RNA 序列的表达载体。

10、包含权利要求 4 所述的 RNA 序列的表达载体。

11、包含权利要求 5 所述的 DNA 序列的表达载体。

12、包含权利要求 6 或 7 所述的 DNA 序列的表达载体。

13、包裹权利要求 1 或 2 所述的 RNA 序列的脂质体。

14、包裹权利要求 3 所述的 RNA 序列的脂质体。

15、包裹权利要求 4 所述的 RNA 序列的脂质体。

16、包裹权利要求 5 所述的 DNA 序列的脂质体。

- 17、包裹权利要求 6 或 7 所述的 DNA 序列的脂质体。
- 18、包裹权利要求 8 所述的表达载体的脂质体。
- 19、包裹权利要求 9 或 10 或 11 所述的表达载体的脂质体。
- 20、包裹权利要求 12 所述的表达载体的脂质体。
- 5 21、将权利要求 1 或 2 所述的 RNA 序列在体内或体外导入真核细胞系、动物及人体的方法。
- 22、将权利要求 3 所述的 RNA 序列在体内或体外导入真核细胞系、动物及人体的方法。
- 23、将权利要求 4 所述的 RNA 序列在体内或体外导入真核细胞系、动物及人体的方法。
- 24、将权利要求 5 所述的 DNA 序列在体内或体外导入真核细胞系、动物及人体的方法。
- 10 25、将权利要求 6 或 7 所述的 DNA 序列在体内或体外导入真核细胞系、动物及人体的方法。
- 26、将权利要求 8 所述的表达载体在体内或体外导入真核细胞系、动物及人体的方法。
- 27、将权利要求 9 或 10 或 11 所述的表达载体在体内或体外导入真核细胞系、动物及人体的方法。
- 15 28、将权利要求 12 所述的表达载体在体内或体外导入真核细胞系、动物及人体的方法。
- 29、将权利要求 13 所述的脂质体在体内或体外导入真核细胞系、动物及人体的方法。
- 30、将权利要求 14 或 15 或 16 或 18 或 20 所述的脂质体在体内或体外导入真核细胞系、动物及人体的方法。
- 31、将权利要求 17 所述的脂质体在体内或体外导入真核细胞系、动物及人体的方法。
- 20 32、将权利要求 19 所述的脂质体在体内或体外导入真核细胞系、动物及人体的方法。
- 33、权利要求 1 或 2 所述的 RNA 序列及其片段用于制备抗 HIV 感染及艾滋病诊断、治疗和预防的药物的应用。
- 34、权利要求 3 所述的 RNA 序列及其片段用于制备抗 HIV 感染及艾滋病诊断、治疗和预防的药物的应用。
- 25 35、权利要求 4 所述的 RNA 序列及其片段用于制备抗 HIV 感染及艾滋病诊断、治疗和预防的药物的应用。
- 36、权利要求 5 所述的 DNA 序列及其片段用于制备抗 HIV 感染及艾滋病诊断、治疗和预防的药物的应用。
- 37、权利要求 6 或 7 所述的 DNA 序列及其片段用于制备抗 HIV 感染及艾滋病诊断、治疗和预防的药物的应用。
- 30

38、权利要求 8 所述的表达载体用于制备抗 HIV 感染及艾滋病诊断、治疗和预防的药物的应用。

39、权利要求 9 或 10 或 11 所述的表达载体用于制备抗 HIV 感染及艾滋病诊断、治疗和预防的药物的应用。

5 40、权利要求 12 所述的表达载体用于制备抗 HIV 感染及艾滋病诊断、治疗和预防的药物的应用。

41、权利要求 13 所述的脂质体用于制备抗 HIV 感染及艾滋病诊断、治疗和预防的药物的应用。

10 42、权利要求 14 或 15 或 16 或 18 或 20 所述的脂质体用于制备抗 HIV 感染及艾滋病诊断、治疗和预防的药物的应用。

43、权利要求 17 所述的脂质体用于制备抗 HIV 感染及艾滋病诊断、治疗和预防的药物的应用。

44、权利要求 19 所述的脂质体用于制备抗 HIV 感染及艾滋病诊断、治疗和预防的药物的应用。

15 45、权利要求 21 所述的方法用于制备抗 HIV 感染及艾滋病诊断、治疗和预防的药物的应用。

46、权利要求 22 或 23 或 24 或 26 或 28 或 29 或 31 或 32 所述的方法用于制备抗 HIV 感染及艾滋病诊断、治疗和预防的药物的应用。

20 47、权利要求 25 所述的方法用于制备抗 HIV 感染及艾滋病诊断、治疗和预防的药物的应用。

48、权利要求 27 所述的方法用于制备抗 HIV 感染及艾滋病诊断、治疗和预防的药物的应用。

49、权利要求 30 所述的方法用于制备抗 HIV 感染及艾滋病诊断、治疗和预防的药物的应用。

说明书

一组抗 HIV 感染及防治艾滋病的核苷酸序列及其应用

5 技术领域

本发明涉及一组抗 HIV 感染及防治艾滋病的核苷酸序列及其应用。

背景技术

10 近两年的研究结果证实短的双链 RNA 在多种哺乳动物细胞中具有干扰 RNA 功能，可以特异抑制特定基因在细胞内的表达。通过该途径也可抑制病毒（包括 HIV 病毒）基因在细胞内的表达。但是由于 HIV 病毒具有极大的变异性，目前所使用的序列均只与少数 HIV 株序列同源，因此不能作为普遍有效的基因治疗药物使用。

发明内容

15 本发明的目的是提供一组抗 HIV 感染及防治艾滋病的核苷酸序列。

本发明的另一个目的是提供上述核苷酸序列的应用。

为实现上述发明目的，本发明采用以下设计方案：

一组抗 HIV 感染及防治艾滋病的 RNA 序列及其片段，该组 RNA 序列如下：

- (1) aucaaugaggaagcugcagaaugg;
- 20 (2) ggggaagugacauagcaggaacuacuag;
- (3) uaaaauaaaauaguaagaauguauagcccu;
- (4) uauggggguaccugugugga;
- (5) gccaaaucccauacauuauugugc;
- (6) uuaaaugggcagucuagcagaa;
- 25 (7) accacacacaaggcuacuucccugau;
- (8) acagccgccuagcauuucaucac;
- (9) ggauggugcuucaagcuaguaccaguu。

一组由所述的 RNA 序列及其片段和与之互补的序列杂交形成的双链 RNA 序列。

一组由所述的 RNA 序列及其片断在其 5' 端或 3' 端加核苷酸修饰的序列。

30 一组所述的 RNA 序列及其片段和与之反向互补的序列加上中间非互补连接序列形成的发

夹样 RNA 双链。

一组所述序列对应的 DNA 序列。

包含所述的 RNA 序列的表达载体。

包含所述的 DNA 序列的表达载体。

5 包裹所述的 RNA 序列的脂质体。

包裹所述的 DNA 序列的脂质体。

包裹所述的表达载体的脂质体。

将权所述的 RNA 序列在体内或体外导入真核细胞系、动物及人体的方法。

将所述的 DNA 序列在体内或体外导入真核细胞系、动物及人体的方法。

10 将所述的表达载体在体内或体外导入真核细胞系、动物及人体的方法。

将所述的脂质体在体内或体外导入真核细胞系、动物及人体的方法。

所述的 RNA 序列及其片段用于制备抗 HIV 感染及艾滋病诊断、治疗和预防的药物的应用。

所述的 DNA 序列及其片段用于制备抗 HIV 感染及艾滋病诊断、治疗和预防的药物的应用。

所述的表达载体用于制备抗 HIV 感染及艾滋病诊断、治疗和预防的药物的应用。

15 所述的脂质体用于制备抗 HIV 感染及艾滋病诊断、治疗和预防的药物的应用。

所述的方法用于制备抗 HIV 感染及艾滋病诊断、治疗和预防的药物的应用。

本发明的优点是：通过同源比较，获得一系列与所有已经发表的 HIV 序列高度同源的 RNA 序列片段，使用该系列片段衍生的双链 RNA 序列可以有效地抑制 HIV 基因的表达；

使用质粒转录的该系列 RNA 也可在细胞内抑制 HIV 基因的表达；携带该片段对应 DNA

20 腺病毒伴随病毒感染细胞后可以转录出对应的双链 RNA 并抑制 HIV 基因的表达。

附图说明

图 1 为报告质粒 pEGFP-gp120 的构建图。

25 图 2 为通过荧光显微镜检测的双链干扰 RNA 可以降低 EGFP-HIV gp120 融合蛋白的表达图。

图 3 为通过 Western-Blot 检测的双链干扰 RNA 可以降低 EGFP-HIV gp120 融合蛋白的表达图。

图 4 为表达内部双链 RNA 的质粒 p-H1-gp120i 的构建图。

图 5 为质粒 pAAV-120i 的构建图。

30 图 6 为通过荧光显微镜检测的携带可转录 HIV gp120 发夹样双链 RNA 的重组 AAV 病

毒可抑制 GFP-GP120 融合蛋白的表达图。

具体实施方式

实施例中采用的方法均为本领域常规操作，详见《分子克隆》第三版。

5 实施例 1：极度保守 HIV RNA 序列的获得

选择已经发表的 HIV1 典型序列，按功能基因分成每个约 70 个核苷酸 (nt) 的片段；每一个片段用 NIH (美国国立卫生研究院) 提供的 BLAST 软件 (BLASTN 2.2.4/2.2.5) 在英特网上分析其在 GenBank (NCBI, 美国国家生物技术信息中心), EMBL (欧洲分子生物学实验室核酸序列数据库), DDBJ (日本 DNA 数据库) 及 GDB (基因组数据库) 不少于 14 万个核苷酸序列中的同源序列；选择出符合以下条件的核苷酸序列：(1) 该片段大于或等于 19 个核苷酸；(2) 该片段在所比较的 HIV 序列中完全同源或至少有 1000 个以上公开序列中该片段完全同源；(3) 不完全同源时，相应序列与该片段仅一个 nt 不同。所获得的序列见表 1，比较结果详见表 2。

表 1. 通过同源比较发现的 HIV 序列中极度保守的 RNA 序列

编号	HIV 基因	RNA 序列
1	gag-pol	aucaaugaggaagcugcagaaugg
2	gag-pol	gggaagugacauagcaggaacuacuag
3	gag-pol	uaaaauaaaauaguaagauguauagcccu
4	env	uaugggguaccugugugga
5	env	gccaaauucccauacauuauugugc
6	env	uuaaauggcagucuagcagaa
7	nef	accacacacaaggcuacuucccugau
8	3-UTR	acagccgccuagcauuucaucac
9	LTR	ggauggugcuucaagcuaguaccaguu

表2. 极度保守 RNA 序列的同源比较结果

编号	HIV 基因	片段大小 (nt)	同源比较的 HIV 序列数	完全同源 序列数	相差一个 nt 序列数
1	gag-pol	24	1050	1050	0
2	gag-pol	27	1051	1050	1
3	gag-pol	29	1050	1048	2
4	env	19	1050	1050	0
5	env	24	1050	1050	0
6	env	21	1050	1050	0
7	nef	26	1082	1082	0
8	3-UTR	23	1070	1070	0
9	LTR	27	1069	1069	0

实施例 2. 使用合成 RNA 双链, 降低 HIV env 基因的表达。

根据上述 env 基因的保守序列 (表 1 中 4 号序列) 19 核苷酸的 RNA 片断, 并根据互补原则合成该链的互补 RNA 链, 在 RNA 链 3' 端加 UU 修饰:

5' uauagggguaccuguguggauu

3' uuauaccccauggacacaccu

如图 1 所示, 质粒 pEGFPC1 (Clontech, CA) 用 EcoRI 和 BamHI 双酶切 (37°C 1 小时) 后回收大片断作为载体; 以 HIV-1 Bru 株 cDNA (2ng) 为模板, 加 gp120 引物 1 (5' cggaattctaaagagcacaaga cagtggac); 和引物 2 (5' cggatcctactctaccgtcagcgctcattga) 各 100ng, Pfu 高保真酶 2.5 单位, dNTP 250μmol/L, 2.5mmol/L MgCl₂, 25mmol/L TrisHCl (pH8.3) 进行 PCR 反应 (94°C 30 秒, 50°C 30 秒, 72°C 90 秒, 使用 Perkin Elmer 9700 型 PCR 仪, 共 30 循环), PCR 产物用 Qiagen Gel Extraction Kit (购自 Biolab) EcoRI 和 BamHI 酶切后与上述载体连接后转化大肠杆菌 JM109 (购自 Promega), 获得完全正确的质粒 pEGFP-gp120, 该质粒转染细胞后可表达绿色荧光蛋白与 HIV gp120 的融合蛋白。

质粒 pEGFP-gp120 1μg 和 1μg 上述合成的 RNA 双链, 使用 LIPOFECTamine 法 (见 Invitrogen 说明书) 共转染 HEK293 细胞 (购自 ATCC), 36 小时后与加 1μg 无关双链 (使用实施例 3 中的 GAG 双链作为无关双链) RNA 的共转染细胞用荧光照相法比较绿色荧光蛋白-GP120 融合蛋白的表达量, 并可通过使用抗 GFP 抗体 (购自 Clontech) 进行免疫印迹

(1B), 比较融合蛋白的表达产量。

结果: 如图 2 所示, 与对照比较, env 基因特异的双链 RNA 使融合蛋白的表达产量显著降低; 重复该实验两次, 分别以 DsRNA1 和 DsRNA2 表示, 如图 3 所示, 该 dsRNA 能降低 GFP-HIV GP120 融合蛋白的表达产量 80% 以上。

5

实施例 3、合成 RNA 双链抑制 gag 基因表达

根据上述 gag 保守序列 (表 1 中 2 号序列) 合成 19 核苷酸的 RNA 片断, 并根据互补原则合成该链的互补 RNA 链, 在互补 RNA 链 3' 端加 UU, 退火后形成 RNA 双链:

5' gugacauagcaggaacuacuu

10

3' uucacuguaucguccuugaug

按照实施例 2 的方法, 通过 PCR 从 HIV (LAV-1, Bru 分离株) cDNA 扩增出 GAG 基因, 克隆至 pEGFP C1 质粒 (Clontech, CA), 该质粒转染细胞后可表达绿色荧光蛋白与 HIV gag 的融合蛋白。

所获得质粒与 RNA 双链, 使用 LIPOFECTamine 法共转染 HEK293 细胞, 36 小时后与不加双链 RNA 的转染细胞通过荧光显微镜观察比较绿色荧光蛋白-GAG 融合蛋白的表达量, 发现该 RNA 可使融合蛋白的表达产量显著降低。

实施例 4. 合成双链 RNA 抑制 nef 基因表达

根据 nef 保守序列 (表 1 中的 7 号序列), 合成 19 核苷酸的 RNA 片断, 并根据互补原则合成该链的互补 RNA 链, 在互补 RNA 链 3' 端加 UU, 退火后形成 RNA 双链:

5' accacacacaaggcuacuuuu

3' uuuggguguguuccgaugaa

按照实施例 2 的方法, 通过 PCR 从 HIV (LAV-1, Bru 分离株) cDNA 扩增出 nef 基因, 克隆至 pEGFP C1 质粒 (Clontech, CA), 该质粒转染细胞后可表达绿色荧光蛋白与 HIV NEF 的融合蛋白。

所获得质粒与 RNA 双链使用 LIPOFECTamine 法共转染 HEK293 细胞, 36 小时后与不加双链 RNA 的转染细胞通过荧光显微镜观察比较绿色荧光蛋白-NEF 融合蛋白的表达量, 发现该 RNA 可使融合蛋白的表达产量显著降低。

30 实施例 5. 使用合成双链 RNA 降低其他 HIV 蛋白的产量

按照实施例 2 所述的方法使用合成双链 RNA 降低相应 HIV 蛋白的产量, 结果见表 3。

表 3 使用新型双链核糖核酸抑制 HIV 其它基因表达的效率

编号	DsRNA	HIV 靶基因	抑制率
1	5' aucaaugaggaagcugcaguu 3' uuuaguuaucuccuucgacguc	gag-pol	++++
2	5' guaagaaugucuagcccuguu 3' uucauucuuacagaucgggac	gag-pol	+++
3	5' uucccauacauauugugcuu 3' uuaaggguauguaauaacacg	env	+++
4	5' aaauggcagucuagcagaauu 3' uuuuuuaccgucagaucgucuu	env	+++

注: +++抑制 60-80%; ++++抑制 80-100%。

- 5 实施例 6、合成含有 env 基因保守序列对应的 DNA 片段及其杂交序列, 克隆至真核表达载体, 在细胞内表达干扰 RNA, 抑制 HIV 膜蛋白的表达

合成含有 env 基因保守序列 (表 1 中 5 号序列) 对应的 DNA 片段及其杂交序列 (黑斜体) 的 DNA 片断, 退火后形成 DNA 片段, 5' 端为 BamHI 位点的末端, 3' 端为 HindIII 位点的末端, 在同源序列及其互补序列中间含有间隔序列。B 为 A 的互补序列:

- 10 A: 5' gatcccc *ttccatacattattgtgct*tcaagaga*gcacaataatgtatggga*atttttgaaa
B: 5' agcttttccaaaa *ttccatacattattgtgct*tctcttgaa*gcacaataatgtatggga*ggg

- 如图 4 所示, 通过 PCR (以人基因组 DNA 1 μ g 为模板, 引物 1 5'-TAATTAATGCGGCCGAATTCGAACGCTGACGTC-3', 引物 2 5'-GCACTAGTAAGCT TGGATCCG TGGTCTCATACAGAACTTATAAGATTCCC-3', 扩增条件同实施例 2) 获得人 H1 RNA 基因的启动子
15 区, 质粒 pEGFPC1 (Clontech) 用 AseI 和 XbaI 酶切后回收大片段作为载体, 上述扩增片段用 AseI 和 SpeI 酶切后回收, 与载体连接, 转化大肠杆菌后获得质粒 pH1。将上述合成的 DNA 片段 (A, B) 退火后克隆至 pH1 质粒的 BamHI 和 HindIII 位点, 构建质粒 pH1-gp120i。该质粒在细胞中, 在 RNA 聚合酶 III 的作用下, 表达发夹状 RNA, 形成 RNA 双链。

- 20 用 4 μ g pH1-gp120i 质粒 (使用同量 pH1 质粒作为对照) 与表达 EGFP-HIV GP120 融合蛋白的质粒共转染 HEK293 细胞, 通过如实施例 2 所述方法比较融合蛋白的表达产量的差异, 结果表明 EGFP-gp120 融合蛋白的表达产量有显著降低: 该结果说明使用质粒载体

携带编码上述 RNA 的 DNA 序列可以有效抑制 HIV 靶基因的表达。

实施例 7. 使用腺病毒伴随病毒载体, 携带如实施例 6 中所述的 H1 启动子及编码发夹状双链 RNA 的 DNA 片段, 重组病毒感染细胞后抑制 HIV GP120 基因的表达。

- 5 如图 5 所示, 质粒 pAAV-MCS (购于 Stratagene) 用 NotI 和 HindIII 酶切; 含 H1 启动子和编码 gp120 的发夹状 RNA 的 DNA 片段从质粒 pH1-gp120i 中用 NotI 和 HindII 酶切获得, 并克隆至 pAAV-MCS 的相应位点. 构建质粒 pAAV-gp120i, 将该质粒(4 μ g) (对照病毒载体用 pAAV-MCS) 与辅助质粒 pHelper(1 μ g, Stratagene) 和质粒 pAAV-RC(2 μ g Stratagene) 一起用 LIPOFECTamine 法共转染 HEK 293FT 细胞, 48 小时后取上清制备 “重
- 10 组 AAV 病毒” 及对照病毒; 将 pEGFP-GP120(1 μ g) 的质粒转染 HEK293 细胞, 然后加入上述含重组病毒的制备上清, 24 小时后用荧光显微镜分析细胞内 GFP 发光强度。

结果如图 6 所示, 表明携带可转录 HIV gp120 发夹样双链 RNA 的重组 AAV 病毒可使 GFP-GP120 融合蛋白表达水平显著降低。

序列表

<110> 北京昭衍新药研究中心
 <120> 一组抗HIV感染及防治艾滋病的核苷酸序列及其应用
 5 <130>
 <160> 9
 <170> PatentIn version 3.1

 <210> 1
 10 <211> 24
 <212> RNA
 <213> 慢病毒属 (*Lentivirus genera*)

 <400> 1
 15 aucaaugagg aagcugcaga augg 24

 <210> 2
 <211> 27
 <212> RNA
 20 <213> 慢病毒属 (*Lentivirus genera*)
 <400> 2
 ggggaagugac auagcaggaa cuacuag 27

 <210> 3
 25 <211> 29
 <212> RNA
 <213> 慢病毒属 (*Lentivirus genera*)

 <400> 3
 30 uaaaauaaaau aguaagaau uauagcccu 29

<210> 4
 <211> 19
 <212> RNA
 <213> 慢病毒属 (*Lentivirus genera*)
 5
 <400> 4
 uauggggguac cugugugga 19
 <210> 5
 10 <211> 24
 <212> RNA
 <213> 慢病毒属 (*Lentivirus genera*)
 <400> 5
 15 gccaaauccc auacauuauu gugc 24
 <210> 6
 <211> 21
 <212> RNA
 20 <213> 慢病毒属 (*Lentivirus genera*)
 <400> 6
 uuaaauggca gucuagcaga a 21
 25 <210> 7
 <211> 26
 <212> RNA
 <213> 慢病毒属 (*Lentivirus genera*)
 <400> 7
 30 accacacaca aggcuaacuuc ccugau 26

<210> 8

<211> 23

<212> RNA

<213> 慢病毒属 (*Lentivirus genera*)

5

<400> 8

acagccgccu agcauuucaa cac

23

<210> 9

10 <211> 27

<212> RNA

<213> 慢病毒属 (*Lentivirus genera*)

<400> 9

15 ggauggugcu ucaagcuagu accagu

27

说明书附图

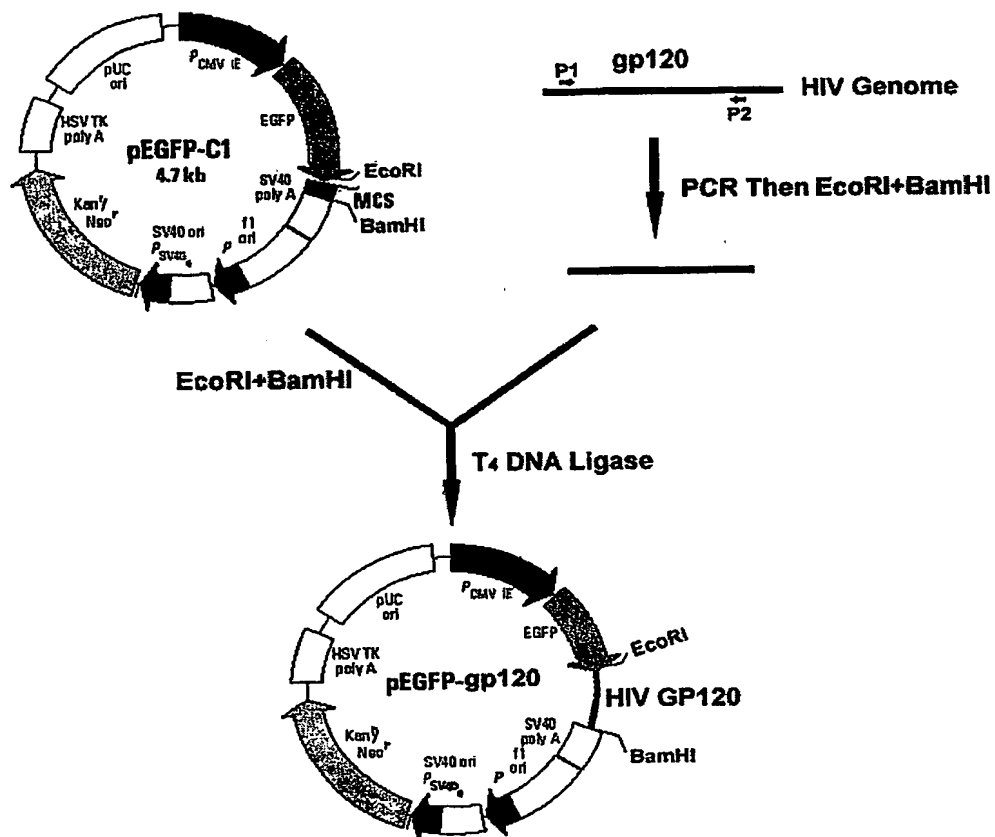
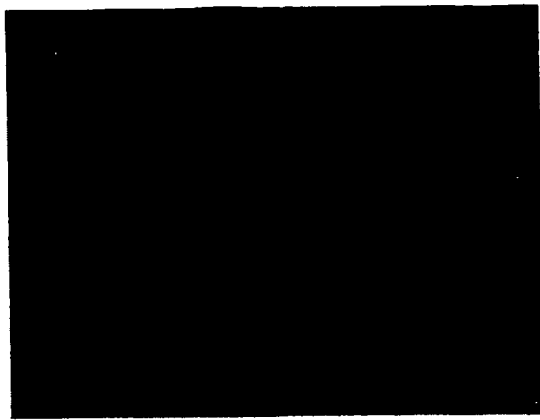
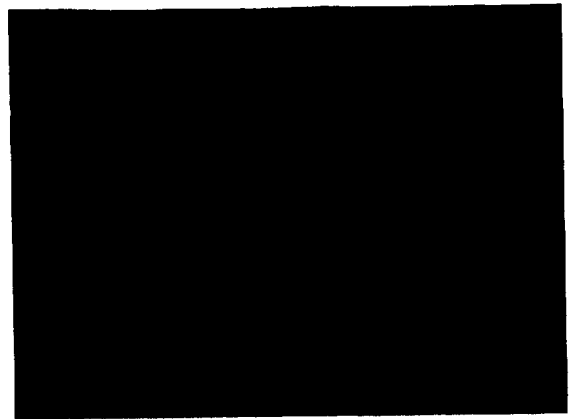


图 1



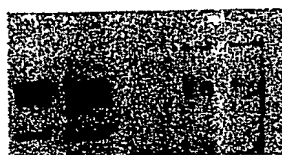
对照



+DsRNA

图 2

EGFP-GP120
EGFP-GP120+Non Specific
Control (pcDNA3Vector)
EGFP-GP120+DsRNA1
EGFP-GP120+DsRNA2



← EGFP-GP120

IB:anti-EGFP

图 3

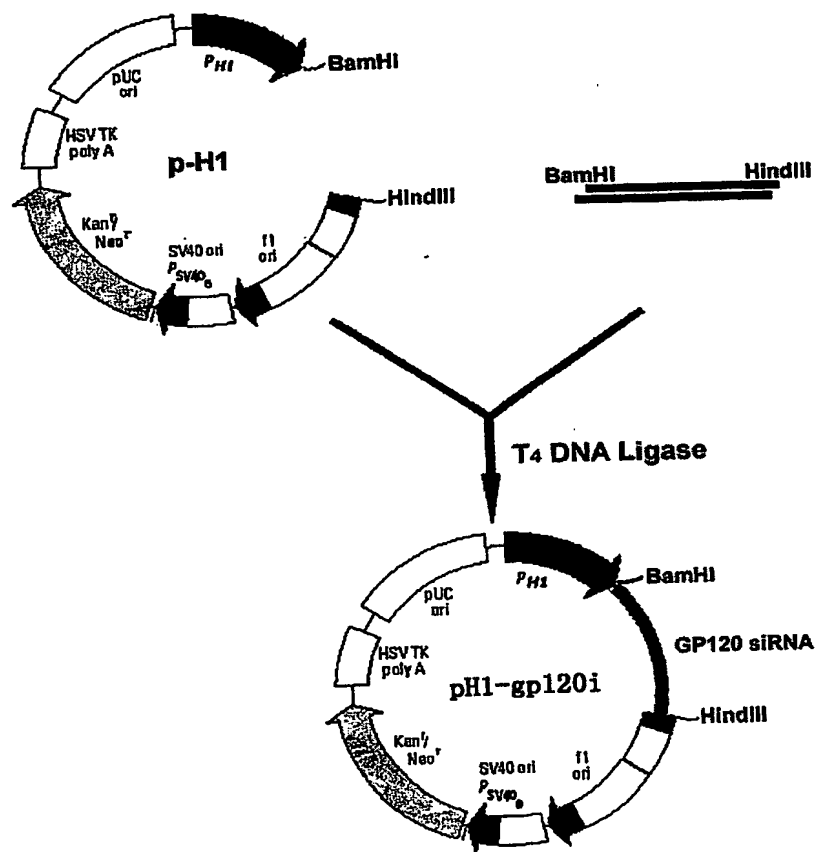


图 4

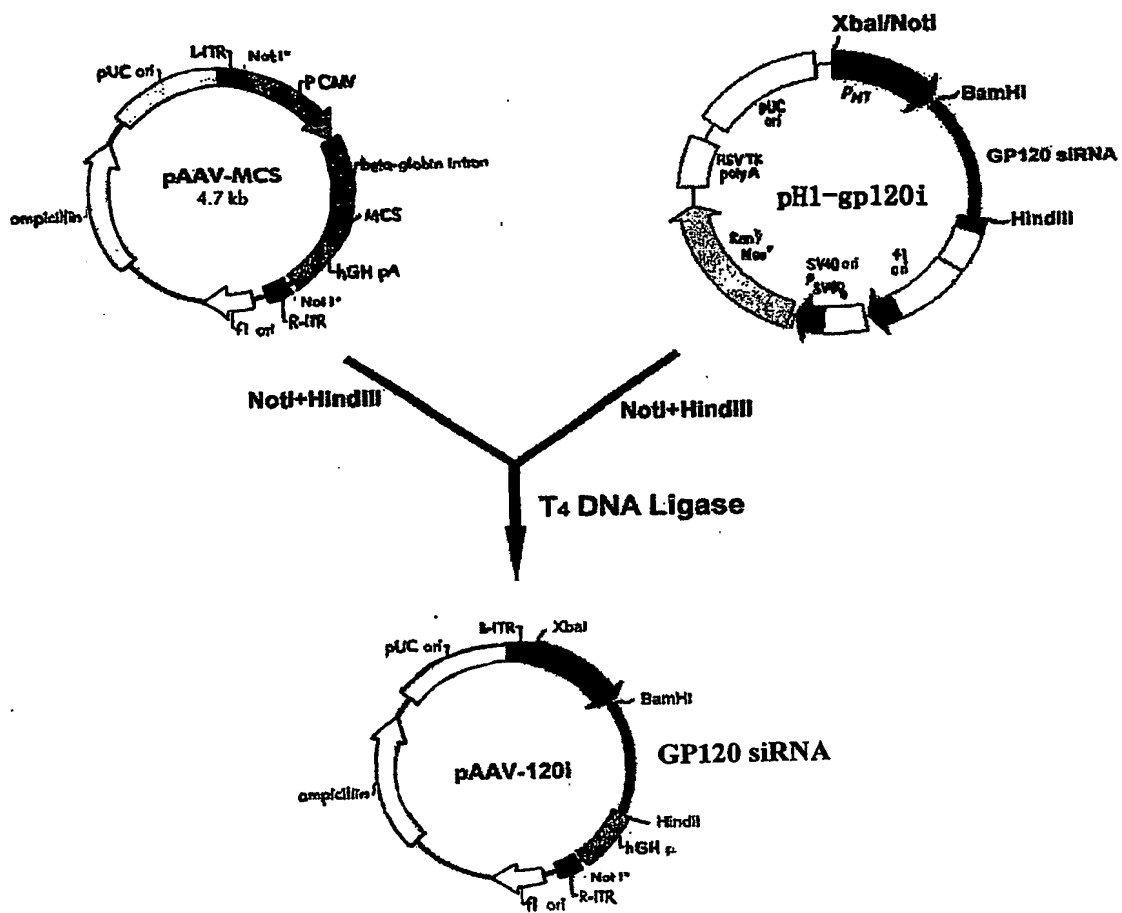
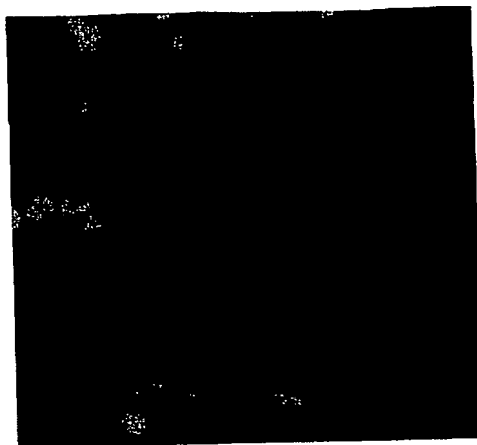
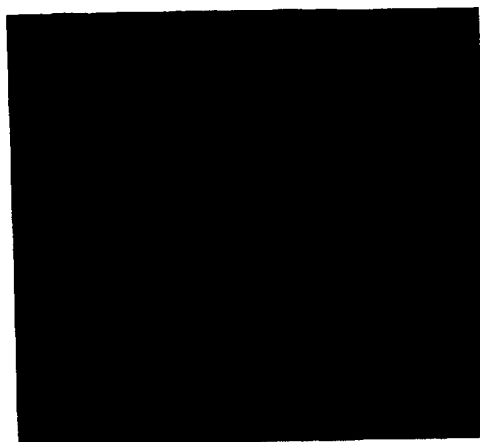


图 5



对照



+DsRNA

图 6

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☐ FADED TEXT OR DRAWING
- ☒ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☒ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.